



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA E CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

**EXTRATO DE *Caesalpinia ferrea* NO MANEJO DA MANCHA MARROM DE
ALTERNARIA EM MUDAS DE TANGERINA ‘DANCY’**

Larissa Cavalcante Almeida

Areia – PB
Fevereiro- 2015

Larissa Cavalcante Almeida

**EXTRATO DE *Caesalpinia ferrea* NO MANEJO DA MANCHA MARROM DE
ALTERNARIA EM MUDAS DE TANGERINA ‘DANCY’**

Monografia apresentada à Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheira Agrônoma.

Areia – PB
Fevereiro - 2015

Larissa Cavalcante Almeida

**EXTRATO DE *Caesalpinia ferrea* NO MANEJO DA MANCHA MARROM DE
ALTERNARIA EM MUDAS DE TANGERINA ‘DANCY’**

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luciana Cordeiro do Nascimento

Aluna: Larissa Cavalcante Almeida

Areia – PB
Fevereiro - 2015

**EXTRATO DE *Caesalpinia ferrea* NO MANEJO DA MANCHA MARROM DE
ALTERNARIA EM MUDAS DE TANGERINA ‘DANCY’**

LARISSA CAVALCANTE ALMEIDA

Monografia aprovada em: ____/ 02/2015

Conceito:

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a. Luciana Cordeiro do Nascimento
Orientadora
(DFCA/CCA/UFPB)

José George Ferreira Medeiros
Doutorando em Agronomia
(PPGA/CCA/UFPB)

Andréa Celina Ferreira Demartelaere
Doutoranda em Agronomia
(PPGA/CCA/UFPB)

Areia – PB
Fevereiro - 2015

DEDICATÓRIA

A minha mãe, pai (in memorian) avó e irmãos, motivo que me faz querer ser melhor a cada dia. Sempre por vocês e pra vocês!

AGRADECIMENTOS

Em nenhuma realização estamos sós. A gratidão é um dos sentimentos mais sublimes de se sentir e que expressa verdadeiramente o reconhecimento de quanto o outro é importante na nossa trajetória e (trans)formação. Meus sinceros agradecimentos...

Ao meu Deus pelo dom da vida e pelas faculdades físicas e mentais que me traz capacidade pra correr atrás dos meus objetivos.

Aos meus pais, Severino Almeida (in memoriam) e em coração sempre, e Maria das Graças Cavalcante pelo exemplo de ser humano, mãe e mulher, a minha eterna gratidão pela existência, carinho, amor e compreensão.

A minha avó, Leopoldina Cavalcante pela existência, apoio, carinho e cuidados ao longo da vida.

Aos meus Irmãos, Vanessa Almeida e Fabiano Almeida pela existência, companhia, amor, carinho e apoio.

As minhas primas, Camila Albuquerque e Amanda Albuquerque pela existência, companhia, amor, carinho e por se fazerem irmãs sempre.

As amigas de toda vida, Danielle Albuquerque e Iane Azevedo pelo carinho, companhia e apoio em todos os momentos.

As companheiras de jornada e amigas pra toda vida, Fernanda Pontes e Vanda Aquino pela companhia e carinho.

A minha professora e orientadora, Luciana Cordeiro do Nascimento, pelo exemplo de profissional e pela oportunidade concedida.

A Andréa Demartelaere, pela ajuda e ensinamentos ao longo desse trabalho, sobretudo pela amizade.

Aos companheiros de laboratório Carolline Vargas, Marciano Nunes, Cristina Marinho e Patrícia Abraão pela ajuda nas atividades e por tornar o trabalho prazeroso e divertido.

Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuição para o melhoramento desse trabalho.

Aos meus familiares por sempre me apoiarem e acreditarem em mim. A todos que, de alguma forma, contribuíram para concretização desse trabalho.

*“Sê humilde para evitar o orgulho,
mas voa alto para alcançar a sabedoria”*

Santo Agostinho

ALMEIDA, L. C. **Extrato de *Caesalpinia ferrea* no manejo da mancha marrom de alternaria em mudas de tangerina ‘Dancy’** Universidade Federal da Paraíba. Areia: CCA/UFPB. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Agronomia). 41f. 2015.

RESUMO- A tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) é acometida por diversas doenças, destacando-se a mancha marrom de alternaria (MMA), causada por *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, que vem promovendo redução na produtividade e causando sérios prejuízos nos pomares brasileiros. A principal forma de controle da doença é o uso de fungicidas sintéticos, então, a busca de produtos naturais, que não degradem o meio ambiente, mostra-se como uma alternativa promissora. O presente trabalho teve como objetivo verificar o potencial do extrato de *Caesalpinia ferrea* no controle da MMA em mudas de tangerina ‘Dancy’. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia-PB. As mudas com 30 dias de cultivo foram adquiridas de pomar comercial na cidade de Remígio-PB (6° 54’ 10” S, 35° 50’ 2” W). Na instalação do experimento as mudas foram pulverizadas com extrato de *C. ferrea* nas concentrações de 10; 100; 500 e 1000 µg/mL; fungicida (8 g/100 L), e água destilada esterilizada (ADE) até ponto de escorrimento. Em seguida foram acondicionadas em câmara úmida e após 24 horas foi realizada a inoculação de *A. alternata* (10⁵ conídios/mL). Após 96 horas iniciaram-se as avaliações de severidade e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e ao 23º dia foi feita a avaliação de incidência da doença. O delineamento foi inteiramente casualizado, constituindo 6 tratamentos com 25 repetições, totalizando uma área experimental de 150 mudas. Para determinação da atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase, peroxidase e polifenoloxidase, foram retiradas 3 folhas/repetição antes e 23 dias após aplicação dos tratamentos. Foi feita a análise de regressão para as concentrações dos extratos e o teste de Dunnett (P<0,05) para comparar com o tratamento T6 no programa SAS[®] System 9.2. O extrato de *C. ferrea* nas concentrações 100 e 500 µg/mL reduziram a incidência de *A. alternata* e a severidade da MMA em folhas de tangerineira ‘Dancy’. As menores taxas da AACPD para a mancha marrom de alternaria foram observadas quando se utilizaram as concentrações 100; 500 e 1000 µg/mL. As maiores atividades da enzima fenilalanina amônia-liase foram observadas nas concentrações 100 e 1000 µg/mL.

Palavras-chave: *Citrus* spp., *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, Indução de resistência

ALMEIDA, L. C. *Caesalpinia ferrea* extract the management of *Alternaria* brown spot in Tangerine seedlings 'Dancy'. Federal University of Paraiba. Areia: CCA/UFPB. Work for course conclusion (Under graduation in Agronomy). 41f. 2015.

ABSTRACT - The tangerine 'Dancy' (*Citrus tangerine* Hort . Ex Tanaka) is affected by various diseases , especially the brown spot *Alternaria* (MMA), caused by *Alternaria alternata* f . sp. *citri*, which has been promoting reduction in productivity and causing serious damage in Brazilian planting. The main form of disease control is the use of synthetic fungicides, then, the search for natural products, which do not degrade the environment, is shown as a promising alternative. This study aimed to verify the potential of *Caesalpinia ferrea* extract on control of MMA in Tangerine 'Dancy' seedlings. The experiment was conducted at Plant Pathology Laboratory in Agricultural Sciences Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia-PB. The seedlings with 30 days of culture were purchased from a commercial planting in Remigio-PB (6° 54' 10" S, 35° 50' 2" W). The experimental setup the seedlings were sprayed with *C. ferrea* extract at concentrations of 10; 100; 500 e 1000 µg/mL; fungicide (8 g/100 L), and sterilized distilled water to point of run-off. Then were placed in a moist chamber and after 24 hours was performed inoculation of *A. alternata* (10⁵ conidia/mL). After 96 hours were done evaluations of severity and incidence of the disease. The design was completely randomized, in 6 treatments with 25 replications, totaling an experimental area of 150 seedlings. To determine the activity of the enzymes phenylalanine, ammonia-lyase , peroxidase and polyphenoloxidase, were removed leaves/repetition before and 23 days after treatment application. Regression test was used for the concentrations of the extracts when evaluated the incidence and severity and the Dunett test at P < 0.05 probability to compare the means of enzymatic analysis. The concentrations of 100 and 500 µg/mL of *C. ferrea* extract decreased incidence of *A. alternata* 27 and 45%, respectively, and lower disease severity (8 and 4%). Just phenylalanine ammonia-lyase showed a significant increase in its activity, the highest values occurring at concentrations of 100 and 1000 mg/mL of *C. ferrea* extract.

Keywords: *Citrus* spp., *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, Induced resistance

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 1- Escala diagramática descrita por Marteli (2011) para avaliação da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*) em mudas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex. Tanaka).....24
- Figura 2 - Incidência em mudas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka), inoculadas com *Alternaria alternata* (10^5 conídios/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia férrea*, ADE, fungicida.....27
- Figura 3- Escala diagramática da severidade em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) (MARTELLI, 2011), inoculadas com *Alternaria alternata* (10^5 conídios/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia férrea*; ADE; fungicida.....28
- Figura 4- Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) inoculadas com *A.alternata* (10^5 conídios/mL) em diferentes concentrações do extrato de *C. ferrea*, ADE e fungicida.....29
- Figura 5- Atividade da fenilalanina amônia-liase em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) inoculadas com *Alternaria alternata* (10^5 conídios/mL), antes aplicação (0); tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea* (10, 100, 500 e 1000 µg/mL) e fungicida.....31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1. Aspectos Gerais da Citricultura	15
3.2. Mancha Marrom de Alternaria (MMA).....	16
3.3. Métodos de controle da Mancha Marrom de Alternaria.....	17
3.4. Atividade enzimática relacionada a patogênese	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Local do experimento	22
4.2 Aquisição das mudas	22
4.3 Preparo e aplicação dos tratamentos	22
4.4 Inoculação de <i>A. alternata</i> em mudas de tangerineira ‘Dancy’	23
4.5 Avaliação de severidade e incidência da MMA em folhas de Tangerineira ‘Dancy’.....	24
4.6 Avaliação da atividade enzimática.....	25
4.6.1. Proteínas totais	25
4.6.2. Atividade da fenilalanina amônia-liase	25
4.6.3. Atividade da Peroxidase.....	26
4.6.4. Atividade da Polifenoloxidase	26
4.7. Análise estatística	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de frutas cítricas e de suco concentrado congelado, possuindo uma área agrícola de aproximadamente de 890 mil hectares destinados ao plantio de laranjas e tangerinas. A produção nacional de laranja foi de aproximadamente 19.811.064 toneladas e a de tangerinas foi de 1.004.727 toneladas na safra de 2013 (IBGE, 2014). Na Paraíba, o maior produtor de citros é o município de Matinhas (7° 7' 30" S, 35° 46' 1" W), situado na região do Brejo Paraibano, obtendo um volume diário de produtividade de aproximadamente 70 toneladas, sendo a tangerina tipo 'Dancy' (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) a mais cultivada (GOVERNO DA PARAÍBA, 2012).

Apesar dos bons índices de produtividade, a citricultura tem sido alvo constante de pragas que foram responsáveis por consideráveis quedas de produção na última década, verificando que as doenças de origem fúngica causam perdas de aproximadamente 80 milhões de caixas de frutas por ano (NEVES et al., 2010). Dentre estas, a mancha marrom de alternaria (MMA) causada pelo fungo *Alternaria alternata* Fr. (Keissler) f. sp. *citri* é uma das que mais infectam a tangerina 'Dancy'. A doença apresenta como sintoma inicial o surgimento de pequenas manchas marrons a pretas, as quais logo se tornam circundadas por halos amarelos, que se expandem, formando áreas necrosadas circulares ou irregulares, podendo envolver uma grande área na folha e, como consequência a desfolhação e redução da produtividade (TIMMER et al., 2000).

O controle da MMA requer uma ou mais táticas empregadas no manejo integrado de doenças. Dentre estas, a utilização de fungicidas sintéticos que são eficientes, porém, podem causar impactos ambientais, ser nocivos ao homem e animais e onerar os custos da produção (COTTAS, 2011). Sendo assim, novas alternativas, como a utilização de extratos vegetais, têm sido estudadas para promover a redução da incidência e severidade de doenças em diversas culturas, tanto pela ação fungitóxica direta quanto por alterações no metabolismo do hospedeiro que, podem ser verificadas através da indução de resistência, apresentando potencial no controle de fitopatógenos (RABELLO et al., 2009).

O pau-ferro (*Caesalpinia ferrea* (Benth.) Ducke) é uma espécie da família Fabaceae, que possui compostos secundários presentes em sua estrutura química, apresentando efeito inibitório sobre a ação de diversos fungos, sendo considerado um método eficiente, por ativar os mecanismos de defesa das plantas (SOUSA; SOARES,

2009). Além disso, seu potencial biológico pode ser mensurado através de compostos associados à biossíntese de substâncias como vitaminas, enzimas, hormônios e polifenóis presentes nos processos fisiológicos dos vegetais (PINTO, 2013).

Dessa forma, o estudo com alternativas ecológicas dentro de um manejo integrado de doenças de plantas, visa resultados promissores, podendo substituir a proteção convencional promovida pela aplicação de fungicidas, contribuindo para atender à crescente demanda mundial por produtos agroecológicos e incrementar a produção (LOPES; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Determinar o potencial do extrato de *C. ferrea* no manejo da mancha marrom de alternaria em mudas de tangerineira “Dancy”.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a incidência e severidade da mancha marrom de alternaria em mudas de tangerineira “Dancy”;
- Mensurar a atividade enzimática, relacionada a respostas de defesa em mudas de tangerineira “Dancy” em função do estímulo de indução de resistência;

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Aspectos Gerais da Citricultura

As espécies citrícolas são originárias das áreas subtropicais e tropicais da Ásia, pertencem à família Rutáceas e têm como principal gênero *Citrus* (L.). No Brasil, as principais espécies cultivadas em plantios comerciais estão distribuídas, basicamente, em seis grupos, sendo: laranjeiras doces [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck], tangerineiras (diversas espécies), limoeiros verdadeiros [*Citrus limon* (L.) Burm. f.], limeiras ácidas e doces (diversas espécies) e pomeleiros (*Citrus paradisi* Macfad.) (PIO et al., 2010).

Dentre as espécies citrícolas, a laranja ainda se destaca como a principal espécie produzida, onde cerca de 70% de sua safra é destinada a indústria para produção de suco concentrado. Dessa forma, a tangerina tem ganhado espaço no mercado, ocupando o segundo grupo de frutas cítricas mais importantes na citricultura mundial, especialmente no que se refere ao consumo *in natura* (NEVES et al., 2010). Esse crescimento pode ser atribuído à demanda por alimentos saudáveis, sendo as tangerinas caracterizadas pelo baixo nível calórico, grande quantidade de fibras, além de sais minerais como magnésio, potássio, cálcio, fósforo e da substância betacaroteno (precursor da vitamina A) (ALVES; MELO, 2014).

A citricultura no Brasil tem se destacado por alavancar o crescimento sócio-econômico, contribuindo com a balança comercial, principalmente no que diz respeito a geração de empregos, tendo como principais regiões produtoras o Sudeste e o Nordeste. (ALMEIDA; PASSOS, 2011). Contudo, apesar do cenário promissor, problemas de ordem fitossanitária podem limitar a produtividade e comprometer a segurança econômica dos produtores (FERREIRA et al., 2013).

Em meio as doenças que incidem sobre a cultura, pode-se destacar aquelas causadas por vírus: leprose (*Citrus leprosis vírus* (CiLV), tristeza dos citros (*Citrus tristeza virus*); fungos: gomose (*Phytophthora citrophthora*), pinta-preta (*Guignardia citricarpa* Kiely), verrugose (*Elsinoe fawcetti*), mancha-preta dos citros (MPC) (*Guignardia citricarpa Phyllosticta citri-carpa* McAlp. Van der Aa), mancha marrom de alternaria (*A. alternata* Fr. (Keissler) f. sp. *citri*); nematóides parasitas: (*Tylenchulus semipenetrans*) e (*Pratylenchus jaehni*) e bactérias: cancro cítrico (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* Hasse), CVC (amarelinho) (*Xylella fastidiosa* Wells) e greening (etiologia desconhecida) (MORAIS, 2014).

Dentre estas, a Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA) tem sido enfatizada desde seu surgimento, pelos sérios danos provocados em pomares de tangerinas, além de ter elevado significativamente os custos de produção em função do manejo adotado para o seu controle (SPÓSITO, 2003).

3.2. Mancha Marrom de *Alternaria* (MMA)

A MMA foi constatada em tangerinas ‘Dancy’ no Brasil pela primeira vez em 2001, no entanto já havia sido relatada em outros países como Austrália, Estados Unidos, África de Sul, Israel, Turquia, Espanha e Colômbia, como causadora de sérios prejuízos (GRUPO CULTIVAR, 2011). Já na Paraíba, a ocorrência da doença nos pomares foi verificada a partir de 2009 (LOPES et al., 2009).

Possui como agente causal *Alternaria alternata* Fr. (Keissler) f. sp. *citri*, um fungo facultativo, que pode sobreviver em restos de folhas e qualquer outro tipo de tecido morto ou em decomposição. Apresenta duas formas: o “patótipo limão rugoso”, que é específico para o limão rugoso (*Citrus jambhiri* Lush) e limão ‘Cravo’ (*Citrus limonia* Osbeck), e o “patótipo tangerina”, que causa doença em tangerineiras e em seus híbridos (tangores e tangelos) (LOPES; ALBUQUERQUE; ARAÚJO, 2009).

Os fungos desse gênero apresentam esporos assexuais que, possuem uma parede espessa de coloração escura, com septos longitudinais e transversais, onde se apresentam resistentes ao ressecamento e outras condições adversas (BARNETT; HUNTER, 1998). Esses conídios são produzidos nos tecidos lesionados de ramos e folhas maduras e liberados após as chuvas ou molhamento dos mesmos por orvalho. A disseminação a longas distâncias ocorre através da ação do vento. As condições ambientais favoráveis à infecção são incrementadas no período de molhamento de 12-14 horas, com temperatura ótima entre 20 e 30 °C (TIMMER, 1999).

O processo de colonização de *A. alternata* f. sp. *citri* em tecidos vivos tem início com a penetração do fungo por ferimentos ou aberturas naturais. Uma vez atingido o interior do tecido, o patógeno começa a liberar uma toxina, cuja função é garantir a destruição das células ao redor do ponto de penetração e assim garantir os nutrientes para sua sobrevivência. A toxina que é produzida pelo agente causal da MMA (toxina ACT) apresenta uma característica peculiar que, é afetar apenas variedades de tangerinas, sendo denominado HST – host specific toxine (toxina específica ao hospedeiro), com ação rápida e causa extravasamento celular (STUART et al., 2009).

Sendo assim, à medida que a ACT transloca no sistema vascular da planta ocorre a expressão dos sintomas, surgindo entre 24 e 36 horas após a infecção. O tamanho da lesão e a extensão da necrose causada pelo patógeno estão diretamente relacionados com a suscetibilidade do hospedeiro (SPÓSITO, 2007).

Em folhas jovens, os sintomas iniciais caracterizam-se por pequenas manchas de coloração marrom ou preta, podendo ser circundadas por halos amarelados que, posteriormente, se estendem, abrangendo grandes áreas da folha. Normalmente, ocorrem nas nervuras, com morte de tecido, espalhando-se a partir delas, provocando curvatura lateral das folhas (REIS et al., 2006).

Nas brotações novas, tanto vegetativas como da florada, apresentam um aspecto de requeima no caule, com morte dos ponteiros e posterior tendência ao envassouramento, pelo superbrotamento. Em ramos finos, ocorrem pequenas lesões corticosas, podendo ocorrer halos cloróticos (FEICHTENBERGER et al., 2005). Já nos frutos, as lesões apresentam coloração marrom-escura, sendo inicialmente deprimidas no centro, podendo apresentar exsudados de consistência viscosa e são circundadas por um halo amarelado, o centro das lesões podem se tornar corticoso e saliente, formando pústulas que se destacam facilmente deixando orifícios na superfície (COTTAS, 2014).

3.3. Métodos de controle da Mancha Marrom de *Alternaria*

Dentre as medidas de manejo recomendadas, o uso de produtos químicos é um dos principais, verificando que, os fungicidas cúpricos estão entre os mais utilizados para o controle da doença. No entanto, estes atuam por contato, não penetrando nos tecidos vegetais, apresentando-se vulneráveis as condições climáticas, sendo necessárias várias aplicações para reduzir a severidade da doença (COLTURATO et al, 2009). Também podemos citar os fungicidas pertencentes ao grupo das estrobilurinas que proporcionam um bom controle da doença, pois possuem atividade pós infecção, reduzindo a produção do inóculo , além dos ditiocarbamatos, triazóis e dicarboximidas (COTTAS, 2014).

Todavia, os fungicidas não se constituem na única medida de controle de doenças, isso porque, a resistência de fungos aos produtos químicos é considerada um dos principais problemas dentro do manejo fitossanitário. Além do mais, nas últimas décadas, a conscientização sobre o uso indiscriminado e incorreto de defensivos

agrícolas no ambiente rural e urbano, causando prejuízos aos ecossistemas e ao homem, tem motivado o desenvolvimento de métodos e produtos alternativos no controle de doenças de plantas (COTTAS, 2015).

Diversos trabalhos demonstram que extratos e óleos extraídos de plantas têm apresentado resultados significativos na redução da severidade de doenças, indicando o potencial dos mesmos no controle de fitopatógenos (SCHWAN-ESTRADA et al., 2008). Neste sentido, a utilização de extratos brutos ou óleos vegetais tem recebido destaque, pela abundância dos recursos naturais brasileiros e pelo fácil acesso ao produtor rural (DEQUECH et al., 2008). Além do mais, os extratos vegetais possuem baixa toxicidade para mamíferos, são biodegradáveis, não persistentes no ambiente e apresentam relativo baixo custo de produção (ISMAN, 2000).

De acordo com Siani et al. (2010) os extratos vegetais são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, apresentando estruturas diversas como terpenos, sesquiterpenos, fenólicos, fenil propanoicos, alifáticos não terpênicos, heteocíclicos, alcoóis, cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, ésteres, acetatos, cada qual com sua característica aromática e ação bioquímica. A espécie *Caesalpinia ferrea* (Benth). Ducke, popularmente conhecida como jucá ou pau-ferro é uma espécie da família Fabaceae. Planta perenifólia a semi-decídua, nativa da mata atlântica, que expandiu do sudeste ao nordeste do Brasil, nas florestas pluviais de encosta atlântica (floresta ombrófila densa) (PATRO, 2013). Esta espécie tem mostrado alto potencial antimicrobiano, por apresentar em sua estrutura compostos bioativos que, são fundamentais na construção de componentes das paredes celulares e estão também associados à síntese das vitaminas, enzimas, hormônios e polifenóis (PINTO, 2013) capazes de ativar os mecanismos de defesas das plantas, sendo considerado um método eficiente no controle de doenças (SOUSA et al., 2009).

3.4. Atividade enzimática relacionada a patogênese

De acordo com Taiz; Zeiger (2013), as plantas possuem mecanismos de proteção natural e estes são baseados em uma série de barreiras pré e pós-formadas. Os fatores de resistência pré-formados, passivos ou constitutivos são aqueles presentes na planta antes do contato com o patógeno. Já os pós-formados, ativos ou induzíveis estão ausentes ou em baixo nível antes da infecção, sendo produzidos ou ativados em resposta à presença do patógeno. Em ambas as categorias, os fatores envolvidos na resistência podem ser

subdivididos em estruturais ou bioquímicos. Os estruturais atuam como barreiras físicas, enquanto os bioquímicos atuam através da produção de substâncias tóxicas ou repelentes ao patógeno (PASCHOLATI, 2011).

No caso dos fatores estruturais pré-formados tem-se a cutícula, tricomas, estômatos, vasos condutores ou fatores bioquímicos, nos quais envolvem a presença de fenóis, alcalóides, fototoxinas, glicosídeos, cianogênicos e glicosídeos fenólicos. Já para os mecanismos pós-formados, as barreiras estruturais podem envolver a lignificação, suberificação, formação de papilas e de camadas de abscisão e de cortiça, bem como as tiloses. Por sua vez, os mecanismos pós-formados podem englobar o acúmulo de fitoalexinas e de proteínas relacionadas a patogênese (PR-proteínas), atividade de quitinases e β -1,3-glucanases (ULBRECHT; BOWMAN, 2007), que são substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno no interior da planta (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008), criando condições adversas, e assim impedindo a colonização dos tecidos vegetais (PASCHOLATI, 2011).

Sendo assim, estes mecanismos de defesa também podem ser ativados quando submetidos aos tratamentos com elicitores que podem ser agentes bióticos ou abióticos, de natureza inorgânica, orgânica ou sintética, atuando como indutores de resistência (STICHER et al., 1997), verificando que uma vez estabelecida, sua durabilidade irá variar em função da concentração do indutor, do inóculo utilizado, do intervalo de tempo entre o tratamento inicial com o indutor e o contato com o patógeno, das condições de temperatura e luminosidade, do agente utilizado para a inoculação e do tamanho da necrose ocorrida em função da inoculação do patógeno (GUZZO, 2004).

Entre os mecanismos envolvidos na resistência sistêmica adquirida (RSA) são conhecidos a resposta de hipersensibilidade (DURRANT; DONG, 2004), alterações estruturais como lignificações, deposição de calose e formações de papilas (STICHER; MAUCH-MANI; MÉTRAUX, 1997), acúmulo de proteínas relacionadas à patogenicidade (DURRANT; DONG, 2004), fenilpropanóides, produtos do metabolismo secundário, como fitoalexinas e compostos fenólicos (LEE; LEON; RASKIN, 1995) e ativação de enzimas chaves como as peroxidases e a fenilalanina amônia-liase (PAL) (CAVALCANTI et al., 2005).

Os mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos envolvem alterações metabólicas que estão correlacionadas com mudanças na atividade de enzimas chaves nos metabolismos primário e secundário. A fenilalanina amônia-liase é uma enzima

chave da via da rota dos fenilpropanóides, onde catalisa a reação de desaminação do aminoácido L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico e amônia (STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008). O ácido trans-cinâmico origina vários fenilpropanóides simples, como os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico, sinápico, que estão em altas concentrações no interior das células vegetais na forma de conjugados com açúcares, ou associados a carboidratos presentes na parede celular ou ácidos orgânicos. Esses compostos simples dão origem a lignina, suberina, cumarinas, flavonoides, antocianinas e fitoalexinas. Nas plantas esses compostos realizam diferentes funções, como suporte mecânico, ação antioxidante, absorção da radiação UV, fatores antinutritivos, proteção contra patógenos e moléculas sinalizadoras (DIXON; PAIVA, 1995).

Tem-se também as peroxidases (PR-9) que, são capazes de catalisar grande número de reações, como a produção ou catálise de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (CHOI et al., 2007), atua na formação de lignina e suberina (QUEIROGA et al., 2000), no catabolismo de auxinas (LAGRIMINI et al., 1995), na cicatrização de ferimentos (MUNZ et al., 1997) e oxidação de compostos fenólicos (TAKAHAMA; ONIKI, 1992), além de estarem envolvidos nos processos de senescência (VELJOVIC-JOVANOVIC et al., 2006), germinação de sementes (SCHOPFER; PLACHY; FRAHRY, 2001) e florescimento (LOKHANDE et al., 2003).

A sua expressão nas plantas está relacionada com a infecção de patógenos, uma vez que, estas atuam no reforço da parede celular a partir da formação da lignina (CHRISTENSEN et al., 2008), suberina (QUEIROGA et al., 2000) e papilas (BROWN et al., 1998), possibilitam a ligação entre glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (COOPER; VARNER, 1983), estão envolvidas na peroxidação de lipídeos (LÉON; LAWTON; RASKIN, 1995) e aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (DAVLETOVA et al., 2005) e de fitoalexinas (KRISTENSEN; BLOCH; RASMUSSEN, 1999).

Já as polifenoloxidasas são enzimas que, se encontram na forma latente em membranas de tilacóides de cloroplastos, bem como de plastídeos e mitocôndria, ou seja, elas não estão em contato com compostos fenólicos que estão armazenados no vacúolo. Durante a senescência ou injúria de células ocorre a ruptura dos cloroplastos e vacúolos, quando as PFOs oxidam os fenóis (YORUK; MARSHALL, 2003). Os produtos da ação de lipoxigenases contribuem para as reações de defesa inibindo o crescimento do patógeno, induzindo fitoalexinas e participando na transdução de sinais

(NAMAI et al., 1990). As fitoalexinas, por sua vez são biocidas, cuja ação sobre fungos inclui a granulação citoplasmática, desorganização dos conteúdos celulares, ruptura da plasmalema e inibição das enzimas fúngicas, o que reflete na inibição da germinação, crescimento do tubo germinativo e do micélio (SACHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, pertencente ao Departamento de Fitotecnia e Ciências Ambientais da Universidade Federal da Paraíba. O preparo do inóculo de *A. alternata* e a diluição do extrato de *C. ferrea* foram realizados no Laboratório de Fitopatologia (LAFIT) e as análises enzimáticas das folhas de tangerineiras tipo ‘Dancy’ no Laboratório de Produtos de Origem Animal (LAPOA), no Centro de Ciências Agrárias-UFPB Campus II, Areia-PB. O preparo do extrato de *C. ferrea* foi feito no Laboratório de Química de Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraíba (UFPB) Campus-I, João Pessoa-PB.

4.2 Aquisição das mudas de tangerineira ‘Dancy’

As mudas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) foram provenientes da cidade de Remígio-PB (6° 54' 10" S, 35° 50' 2" W), com 30 dias de cultivo, possuindo cinco a seis folhas definitivas por planta e foram cultivadas em sacos plásticos (10 x 15 cm) contendo areia esterilizada e substrato vermiculita na proporção (2:1).

4.3 Preparo e aplicação dos tratamentos com extrato de *C. ferrea*

As folhas de pau-ferro foram coletadas na Área Experimental da Chã de Jardim, do CCA, Campus II, Areia-PB (6° 57' 42" Sul e 35° 41' 43" Oeste) e dispostas em sacos de papel, sendo levadas à estufa com temperatura constante de 60 °C por um período de 72 h, até a obtenção de peso seco. Posteriormente, as folhas foram trituradas (pó), em seguida pesadas 100 g e colocadas em recipientes de vidro em temperatura ambiente (25 ± 2 °C) com adição de 200 mL de etanol (96%), agitadas duas vezes ao dia, por um período de 72 horas em infusão (LIMA et al., 2010).

Em seguida, por meio de evaporador rotativo, foi extraído à frio o concentrado e levados à estufa de circulação forçada por um período de uma hora, até atingir uma consistência pastosa do extrato bruto. Posteriormente, foi feita a diluição do extrato em ADE com ajuda de um agitador magnético por um período de duas horas para obtenção das seguintes concentrações: 10, 100, 500 e 1000 µg/mL.

As mudas foram borrifadas com os tratamentos até ponto de escoamento, e em seguida foram acondicionadas em câmara úmida, confeccionadas com sacos plásticos de polietileno transparente, vedados na extremidade e borrifados com água destilada, por um período de 24 horas, em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$).

Os tratamentos foram compostos por T1- Extrato de pau-ferro 10 $\mu\text{g/mL}$, T2- Extrato de pau-ferro 100 $\mu\text{g/mL}$, T3- Extrato de pau-ferro 500 $\mu\text{g/mL}$, T4 - Extrato de pau-ferro 1000 $\mu\text{g/mL}$, T5- Testemunha (ADE), T6- Fungicida Azoxystrobin (8 g/100 L de água).

4.4 Inoculação de *A. alternata* em mudas de tangerineira ‘Dancy’

O isolado de *A. alternata* foi obtido a partir de frutos cítricos com sintomas típicos da mancha marrom de alternaria, em área produtora no município de Lagoa Seca-PB ($7^\circ 10' 15'' \text{S}$ e $35^\circ 51' 14'' \text{W}$). Os frutos foram desinfestados por meio de lavagens (etanol 70%, por trinta segundos, hipoclorito 1%, por três minutos e duas lavagens com água destilada esterilizada), em seguida, retiraram-se três fragmentos de 5 mm e foram incubados em meio de cultura BDA (200 g batata, 20 g dextrose, 20 g ágar L^{-1}) acrescido do fungicida Carbendazin (500 mL/L de água), para inibição da proliferação de fungos contaminantes e incubados em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) durante sete dias (COLTURATO, 2006).

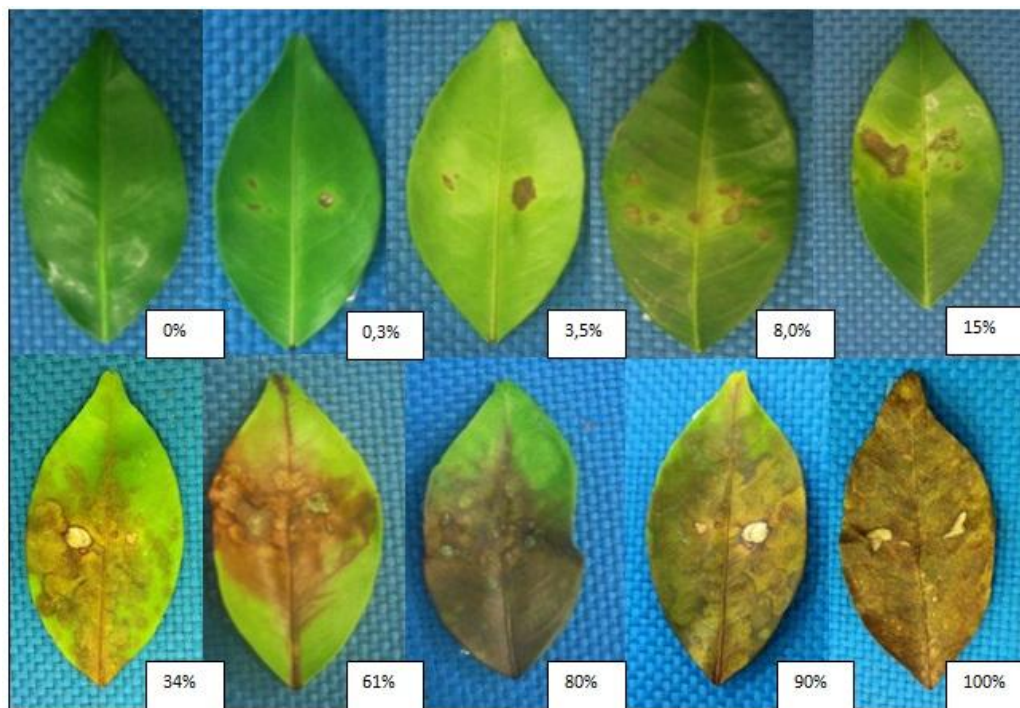
Para confirmar a identidade dos isolados, três discos com 5 mm de diâmetro com colônias do fungo foram transferidos para o meio carbonato de cálcio: CaCO_3 (30 g de CaCO_3 , 20 g de sacarose e 20 g de ágar L^{-1}), para indução de esporulação de *A. alternata*, onde foram mantidos em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e, após sete dias de cultivo, foi realizada a identificação em microscopia ótica (CANIHOS, PEEVER, TIMMER, 1999; MENEZES, 2006,).

Após aplicação dos tratamentos com extrato de *C. ferrea*, fungicida e ADE (testemunha), foram realizadas lesões na face abaxial das folhas, de aproximadamente 1 mm de profundidade em quatro folhas por mudas, com o auxílio de um bisturi esterilizado. Em seguida, foi adicionada a suspensão de esporos obtida através da adição de 10 mL de água destilada esterilizada (ADE) nas placas contendo as colônias do fungo e, com o auxílio de uma espátula estéril, os conídios foram raspados, filtrados em dupla camada de gaze esterilizada e quantificados em hemocitômetro, para a

composição de uma suspensão de 10^5 conídios/mL de *A. alternata*, acrescida de Tween 20 (2 gotas/L). Com auxílio de um borrifador manual, foi realizada a pulverização do inóculo nas mudas até atingir o ponto de escorrimento.

4.5 Avaliação de severidade e incidência da MMA em folhas de Tangerineira ‘Dancy’

Após 96 horas da inoculação de *A. alternata*, foram realizadas diariamente as avaliações da severidade, mediante emprego de escala diagramática (0%; 0,3%; 3,5%; 8%; 15%; 34%; 61%; 80%; 90% e 100% de área lesionada) estabelecida por Martelli, (2011).



a

Figura1. Escala diagramática descrita por Martelli (2011) para avaliação da mancha marrom de alternaria (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*) em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex. Tanaka)

Após 23 dias da inoculação, foi feita a avaliação da incidência, determinada através da percentagem de incidência (%) através do número mudas com sinais da mancha marrom de alternaria (MMA), com base em Sangoi et al. (2000), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Incidência (\%)} = \frac{(\text{Mudas infectadas} * 100)}{\text{Total de mudas}}$$

Posteriormente, foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). Pela fórmula $\{S [(y_i + y_{i+1})/2] \cdot (t_{i+1} - t_i)\}$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de incidência observados na avaliação e $t_{i+1} - t_i$ o intervalo entre avaliações.

4.6. Avaliação da atividade enzimática

No primeiro e aos 23 dias após a aplicação dos tratamentos, foram retiradas três folhas por planta de cada repetição, totalizando 75 folhas, para a quantificação das proteínas, macerando-se 0,02 g de folhas em almofariz com 4,0 mL de tampão de acetato de sódio (50 mM), (pH 5,2). A mistura foi filtrada em tecido de trama fina e a suspensão foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 min, a 4 °C. O sobrenadante coletado de cada amostra foi transferido para microtubos de 2 mL e mantido a -80°C até o momento das análises. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e foi realizada a correlação entre a atividade enzimática e a incidência da mancha marrom de alternaria.

4.6.1. Proteínas totais

As proteínas solúveis contidas nos extratos foram aferidas pelo ensaio de Bradford (1976), através da curva padrão, onde foi adicionada 100 µL de uma solução de BSA (µg/µL), a partir dessa solução, foram feitas as diluições seriadas em água ADE para a obtenção das demais concentrações (0 µg/µL; 2 µg/µL; 4 µg/µL; 6 µg/µL; 8 µg/µL; 10 µg/µL). Em seguida, a preparação do branco, através da adição em um tubo de microcentrífuga 50 µL água ADE e 100 µL de Bradford. E para o preparo da amostra, foi adicionando em um tubo de microcentrífuga 50 µL do extrato e 1000 µL de Bradford. As reações feitas anteriormente foram incubadas em temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida, foi medida a absorbância em comprimento de onda 595 nm e expressa em U.A./min./mg de proteína.

4.6.2. Atividade da fenilalanina amônia-liase

Determinada pela quantificação do ácido trans-cinâmico liberado a partir da fenilalanina (UMESHA, 2006). Para isso, foi adicionado 250 µL de extrato, 1500 µL de tampão Tris-HCl (100 mM) (pH 8,8), 500 µL de fenilalanina (100 mM) e 750 µL de

ADE, incubado a 40 °C por 60 minutos. Logo após, a reação foi paralisada com a adição de 100 µL de ácido clorídrico (5,0 M). A leitura foi realizada em cubeta de quartzo no espectrofotômetro (Lightwave II, WPA, Biochron) por meio de variação na absorbância em comprimento de onda 290 nm e expressa em U.A/min./mg de proteína.

4.6.3. Atividade da Peroxidase

Foi determinada da reação que consistiu na adição de 750 µL do tampão de reação (tampão fosfato de sódio (100 mM)) (pH 6,0), 250 µL de guaiacol (1,7%), 250 µL (H₂O₂) e 250 µL composto por: 150 µL de água + 100 µL do extrato, onde o guaiacol peroxidase converteu o guaiacol em tetraguaiacol. A reação foi paralisada com a adição de 800 µL de ácido perclórico (2,0 M) e monitorada a por um período de 2 min e a cada 15 segundos foram realizadas leituras para verificar a atividade da enzima peroxidase com comprimento de onda de 470 nm e expressa em U.A/min./mg de proteína (RONCATO; PASCHOLATI, 1998).

4.6.4. Atividade da Polifenoloxidase

Foi realizada através da conversão de catecol em quinona, com adição de 250 µL de catecol (60 mM), 750 µL do tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8) e 250 µL de extrato. As amostras foram aquecidas em banho Maria a 40 °C durante 15 minutos, seguido de esfriamento. Logo após, a reação foi paralisada com a adição de 800 µL de ácido perclórico (2,0 M), com a medida de absorbância registrada a 395 nm. Os resultados foram expressos em U.A/min./mg de proteína (DUANGMAL, APENTEN, 1999).

4.7. Análise estatística

O delineamento foi inteiramente casualizado com seis tratamentos, com 25 repetições por tratamento sendo cada repetição composta por uma muda.

Foi feito análise de regressão para as concentrações dos extratos quando avaliou a incidência e severidade e o teste de Dunnett ($P < 0,05$) para a comparação das médias das análises enzimáticas no programa SAS[®] System 9.2.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliando a incidência de *A. alternata* em mudas de tangerineira ‘Dancy’, observou-se efeito quadrático nas concentrações de *C. ferrea* (Figura 2), com redução da incidência até a concentração de 500 µg/mL. Na concentração de 1000 µg/mL a incidência aumentou, superando os demais tratamentos. Não houve diferença estatística entre as mudas tratadas com o fungicida e a testemunha (ADE).

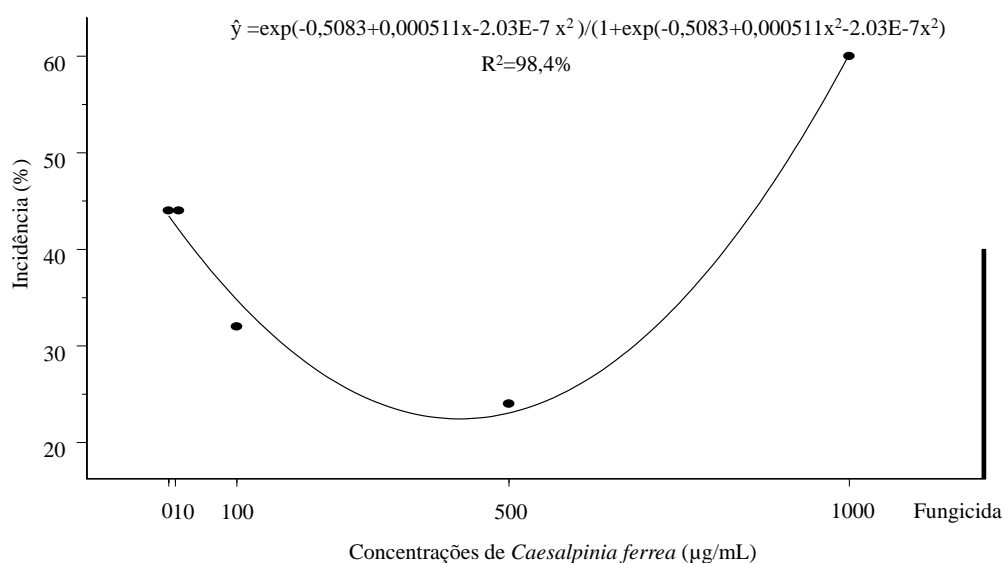


Figura 2. Incidência em mudas de tangerina ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka), inoculadas com *Alternaria alternata* (10^5 conídios/mL) em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea*, ADE e fungicida.

A redução na incidência de *A. alternata* do presente trabalho pode estar condicionada a eficiência do extrato de pau-ferro. Uma vez que, os taninos presentes na composição química da referida espécie vegetal, podem ter atuado formando complexo com proteínas, vitaminas, enzimas e íons metálicos (MONTEIRO et al., 2005). Sendo assim, a reunião de vários componentes químicos se comporta de forma sinérgica, apresentando potencial no controle de patógenos, devido a atuação fungicida ou fungistática (SILVA, 2001).

Ao avaliar a severidade da MMA em folhas de tangerineira ‘Dancy’ observou-se também efeito quadrático para as concentrações do extrato de *C. ferrea* (Figura 3),

verificando diminuição da severidade da doença (73,48% e 88,24) com o aumento da concentração, atingindo valores mínimos na escala de nota nas concentrações 100 e 500 µg/mL em relação à testemunha. Com aplicação do fungicida, a severidade apresentou escala de nota semelhante nas concentrações de 10 e 1000 do extrato de *C. ferrea*.

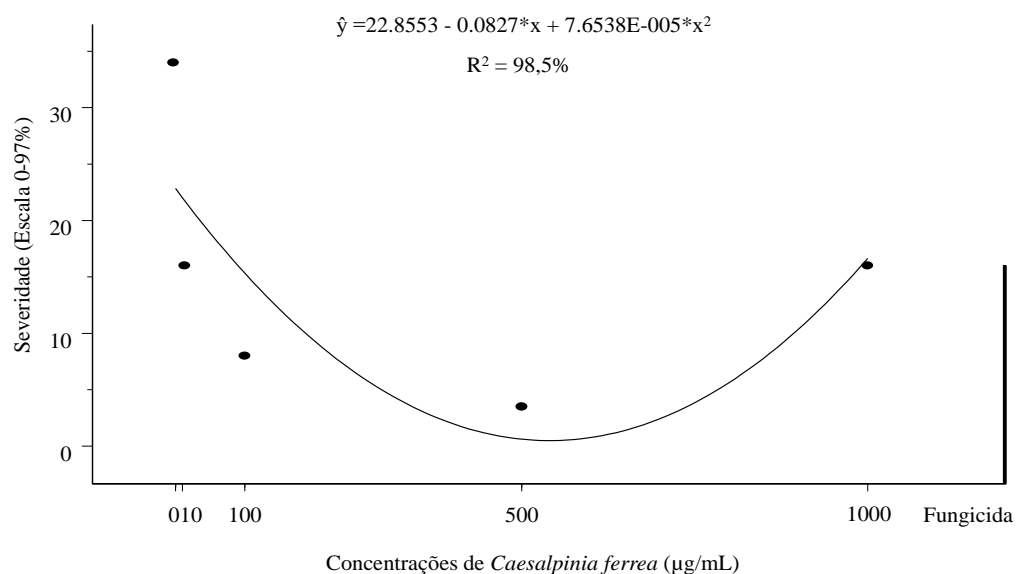


Figura 3. Escala diagramática da severidade em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. Ex. Tanaka) inoculados com *Alternaria alternata* (10^5 conídios/mL), em diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea*, ADE e fungicida.

Verificou-se que nos tratamentos utilizando o extrato de *C. ferrea* nas concentrações de 0 (Fig. 4a) e 10 µg/mL (Fig. 4b) houve aumento na AACPD, já nas concentrações 100 (Fig. 4c); 500 (Fig. 4d) e 1000 µg/mL (Fig. 4e) obtiveram redução, apresentando uma proteção de 33,34; 55,55 e 44,44% respectivamente, para a mancha marrom de alternaria, em folhas de tangerineira ‘Dancy’ quando comparadas com o fungicida até o vigésimo terceiro dia de avaliação.

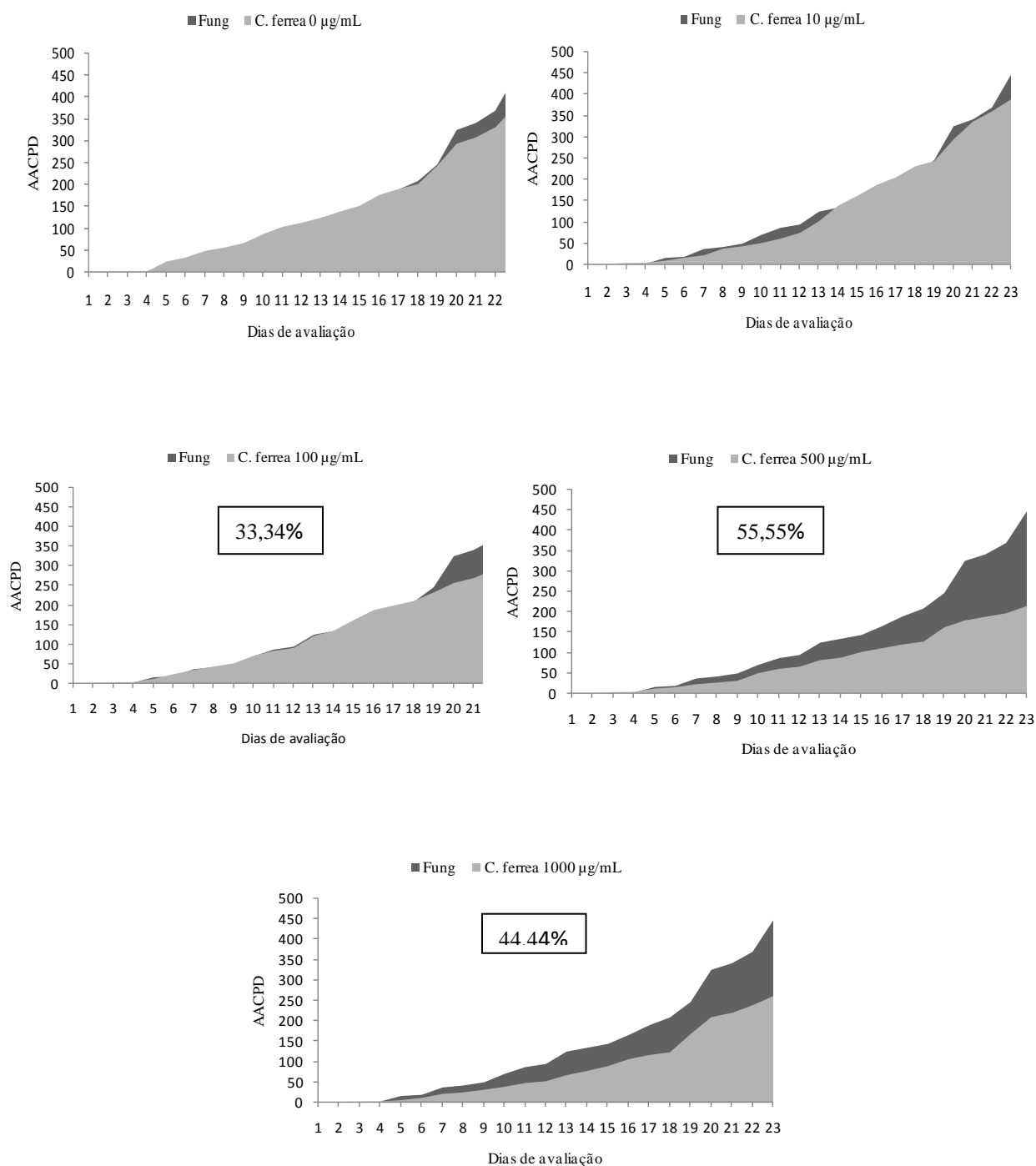


Figura 4.. Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de tangerineira ‘Dancy’ (*Citrus tangerina* Hort. ex Tanaka) inoculadas com *A.alternata* (10^5 conídios/mL) em diferentes concentrações do extrato de *C. ferrea*, ADE e fungicida.

A redução na severidade da MMA apresentada no presente trabalho pode ter ocorrido devido a indução de resistência em mudas de tangerineira ‘Dancy’ através da aplicação do extrato de pau-ferro. Onde Pinto (2013) ao estudar o perfil fitoquímico do extrato de pau-ferro no controle da MMA em citros, constatou a presença de aminoácidos como triptofano, alanina, tirosina, fenilalanina, leucina e do tanino hidrolisado (ácido gálico). Esses aminoácidos encontram-se associados a síntese de proteínas, sendo fundamentais á construção de componentes das paredes celulares, além da síntese de vitaminas, enzimas, hormônios e polifenóis que são responsáveis pela produção de fitoalexinas, proteínas, ácido jasmônico e salicílico induzindo a resistência.

Borges et al. (2013) avaliando o potencial do extrato de jurema preta (*Mimosa tenuiflora*) no controle da mancha marrom de alternaria (*Alternaria cucumerina* (Ell&Ev.) Ellio) em mudas de melancia (*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsumura & Nakai) constataram redução na severidade doença a níveis de até 31% em relação a testemunha. De acordo com Bezerra et al. (2011), o extrato dessa espécie apresenta atividade antimicrobiana devido a ação de taninos, saponinas e flavonóides presentes em todas as partes da planta. Milaneze (2013) utilizando controle alternativo em plantas de tangerineiras tangor Murcott [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck x *C. reticulata* Blanco] no manejo da mancha marrom de alternaria, verificou redução na AACPD em folhas quando utilizou o tratamento com aplicação de calda sulfocálcica.

Analisando a enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (Figura 4), verificou-se aumento na atividade da enzima nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL do extrato de *C. ferrea*, quando comparado aos demais tratamentos, atingindo valor máximo para concentração de 1000 µg/mL. Já o valor mínimo na atividade da enzima ocorreu para concentração de 500 µg/mL do extrato.

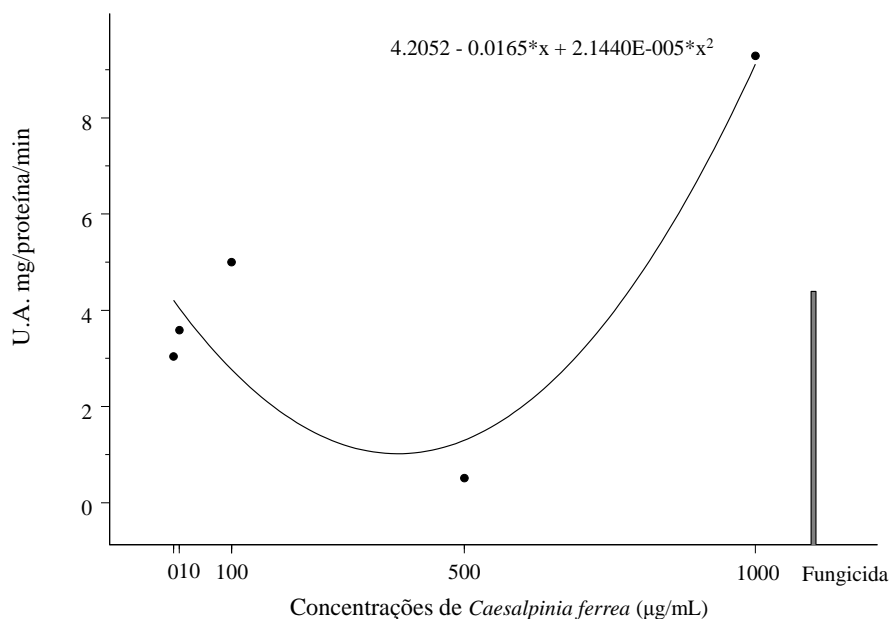


Figura 5- Atividade da fenilalanina amônia-liase em folhas de tangerina ‘Dancy’ inoculadas com *Alternaria alternata* (10^5 conídios/mL), antes aplicação (0); tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Caesalpinia ferrea* (10, 100, 500 e 1000 µg/mL) e fungicida.. Areia-PB, 2014.

De acordo com Almeida et al (2012), a fenilalanina-amônia-liase está envolvida no primeiro passo da síntese dos fenilpropanóides, com a conversão de fenilalanina em ácido-trâns-cinâmico, o que resulta em compostos como as fitoalexinas e, principalmente em lignina, que conferem resistência à parede celular e atuam como sinalizadores em resposta de defesa. A enzima atua na biossíntese e na regulação da síntese de compostos fenólicos. O aumento dessa atividade indica que, o extrato pode ter atuado como elicitor, induzindo resistência sistêmica nas mudas (FREDDO, 2012).

Resultados similares foram obtidos por Gomes (2011) ao avaliar diferentes concentrações do extrato etanólico de *Allamanda blanchetti* (Apocynaceae) no controle de oídio (*Uncinula necator*) em videiras ‘Superior Seedless’, onde as plantas tratadas com o extrato na concentração de 100 µg/mL apresentaram resultados mais expressivos no aumento da atividade da FAL em relação aos demais tratamentos, além de redução na severidade da doença a níveis superiores a 35%.

No presente trabalho, a maior atividade da FAL em mudas de tangerina ‘Dancy’ foi observada na concentração de 1000 µg/mL do extrato de *C. ferrea*, em contrapartida,

as mudas desse tratamento apresentaram o maior percentual de incidência de *A. alternata*, chegando a níveis de 60%. Nesse caso, o aumento na produção de tal enzima pode estar relacionado com o processo de infecção causado pelo patógeno (Rahman; Punja, 2005).

Não observou-se diferença estatística quando avaliaram as atividades da peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) em folhas de tangerineira ‘Dancy’ inoculadas com *A. alternata* (10^5 conídios/mL) nas concentrações 0; 10; 100; 500 e 1000 µg/mL do extrato de *C. ferrea*, quando comparou com o tratamento fungicida, apresentando médias (120,58; 262,16; 15,33; 256,92 e 116,94 U.A mg/proteína/min) e (1,31; 0,83; 0,19; 0,82; 1,37 e 0,74 U.A mg/proteína/min) respectivamente.

O fato ocorrido no presente trabalho, pode ser explicado por Santos et al (2007), onde ao avaliarem o efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico, observou que o aumento na atividade das mesmas não se manteve constante durante o experimento, indicando a possibilidade da resposta da planta aos extratos não ter coincidido com o tempo adotado para avaliação.

Shahbazi et al (2010), ao estudarem o patossistema *Alternaria solani* em *Solanum tuberosum*, verificaram que o aumento na atividade da peroxidase ocorreu em intervalos de tempo inferiores a sete dias. Dados similares foram obtidos por Silva et al. (2011) ao avaliar a indução de resistência à antracnose (*Colletotrichum lagenarium*) por *Trichoderma* spp. em pepineiro (*Cucumis sativus* L.) onde não foi observado aumento na atividade da enzima 7 dias após o tratamento das plantas.

Em relação à polifenoloxidase, Silva; Pascholati; Bedendo (2007), ao testarem o potencial elicitor dos extratos aquosos de *Agaricus blazei* e *Lentinula edodes* em berinjela (*Solanum melongena*. L) contra *Ralstonia solanacearum*, observaram que as plantas apresentaram atividade enzimática superior a testemunha, apenas do 3º ao 12º dia após aplicação do extrato.

6. CONCLUSÃO

- ✓ O extrato de *C. ferrea* nas concentrações 100 e 500 µg/mL reduziram a incidência de *A. alternata* e a severidade da MMA em folhas de tangerineira ‘Dancy’;
- ✓ A menor severidade para a mancha marrom de alternaria foi observada nas concentrações 100; 500 e 1000 µg/mL do extrato de *C. ferrea* em folhas de tangerineira ‘Dancy’;
- ✓ A maior atividade da enzima fenilalanina amônia-liase em folhas de tangerineira ‘Dancy’ foi observada nas concentrações 100 e 1000 µg/mL do extrato de *C. ferrea*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, H. O.; BARBOSA, M. O.; MARQUES, A. R.; T. H. A.; MAGALHÃES JÚNIOR, M. J.; TESSAROLLO, N. G.; GAMES, P. D.; BARROS, E. G.; MOREIRA, R. S.; GUIMARÃES, F. C. M.; ABDELNOOR, R. F.; PEREIRA, P. R. G.; PEREIRA, M. C. B. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem- asiática- da- soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.47, n.2, p.163-172. 2012.

BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. St Paul, Minnesota: **APS Press**, 218p. 1998.

BEZERRA, D. A. C.; RODRIGUES, F. F. G.; COSTA, J. G. M.; PEREIRA, A. V.; SOUSA, E. O.; RODRIGUES, O. G. Abordagem fitoquímica, composição bromatológica e atividade antibacteriana de *Mimosa tenuiflora* (Wild) Poiret E Piptadeniastipulacea (Benth) Ducke. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 33, n. 1, p. 99-106, 2011.

BORGES, I. V.; PEIXOTO, A. R.; CAVALCANTI, L. S.; LIMA, M. A. G.; SILVA, M. S. Extratos de jurema preta no controle de mancha-dealternaria em melancia. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 26, n. 3, p. 36 – 45, 2013

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities for proteins utilizing the principle of protein- dye binding. **Analytical Biochemistry**. San Diego, v.72, p.248- 254, 1976.

BROWN, I.; TRETHOWAN, J.; KERRY, M.; MANSFIELD, J.; BOLWELL, G. P. Localization of components of the oxidative cross-linking of glycoproteins and of callose synthesis in papillae formed during the interaction between non-pathogenic strains of *Xanthomonas campestris* and French bean mesophyll cells. **Plant Journal**, Malden, v. 15, n. 3, p. 333-343, 1998.

CAVALCANTI, L.S.; BRUNELLI, K.R.; STANGARLIN, J.R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L.S.; DI PIERO, R.M.; CIA, P.; PASCHOLATI, S.F.; RESENDE, M.L.V.; ROMEIRO, R.S. (Eds.).

Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos. Piracicaba: FEALQ p.81-124. 2005.

CHOI, H. W.; KIM, Y. J.; LEE, S. C.; HONG, J. K.; HWANG, B. K. Hydrogen peroxide generation by pepper extracellular peroxidase CaPO2 activates local and systemic cell death and defense response to bacterial pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 145, p. 890-904, 2007.

CHRISTENSEN, J. H.; BAUW, G.; WELINDER, K. G.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. Purification and leaf water potencial responses of *Alnus glutinosa* saplings to stem-base inoculation with *Phytophthora alni* subsp. *alni*. **Tree Physiology**, Oxford, UK, v. 28, p. 1703-1711, 2008.

COLTURATO, A. B. **Efeito do meio de cultura, temperatura, fotoperíodo e fungicidas no crescimento micelial e no controle de *Alternaria alternata* f. sp. *citri*, causador da mancha marrom do tangerino murcott.** Universidade Estadual Paulista- Faculdade de Ciências agrônômicas. Dissertação (Mestrado). Botucatu-SP, 53f. 2006.

COLTURATO, A. B.; PAULOSSI, T.; VENÂNCIO, W. S.; FURTADO, E. L. Efficiency and cost of chemical control of alternaria brown spot. **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p.210-215, 2009.

COOPER, J. B.; VARNER, J. E. Insolubilization of hydroxyproline-rich cell wall glycoprotein in aerated carrot root slices. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 112, n. 1, p. 161-167, 1983.

COTTAS, M. P. Mancha marrom de alternaria, uma opção de controle. Disponível em: <<http://www.agrofit.com.br/portal/citros/54-citros/105-mancha-marrom-de-alternaria-uma-opcao-de-controle>>. Acesso em: 29 fev. 2015.

DAVLETOVA, S.; RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHENGQIANG, Z.; OLIVER, D. J.; COUTU, J.; SHULAEV, V.; SCHLAUCH, K.; MITTLER, R. Cytosolic ascorbate peroxidase is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 1, p. 268-281, 2005.

DEQUECH, S. T. B.; SAUSEN, C. D.; LIMA, C. G.; EGEWARTH, R. Efeito de extratos de plantas com atividade inseticida no controle de *Microtheca ochroloma* Stal (Col.: Chrysomelidae), em laboratório. *Biotemas*, v.21, n.1, p. 41-46, 2008.

DIXON. R. A.; PAIVA, N. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenol oxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, London, v.64, p.351-359, 1999.

DURRANT, W.E.; DONG X. Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.42, p.185-209, 2004.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M B.; PIO, R. M; CASTRO, J.L. Seleção de tangerinas e híbridos de citros para a tolerância à Mancha Marrom de *Alternaria* (*Alternaria alternata* Keissler). **Citricultura atual**. Cordeirópolis, n. 45, v.8, p. 08-10, 2005.

FERREIRA, J. T. P.; FERREIRA, E. P.; SILVA, W. C.; MONTEIRO, J. H. A.; ROCHA, I. T. M.; ALBUQUERQUE, K. N.; PANTALEAO, F. S. Estudo fitossanitário em pomares de laranja lima (*Citrus sinensis* (L.) Osb.) em Santana do Mundaú- AL. **Agropecuária científica no semiárido**. V.9, p. 62-61, 2013

FREDDO, A. R.; MAZARO, S. R.; WAGNER JÚNIOR, A.; BRUN, E. J. Indução de resistência ao tombamento de plântulas de eucalipto pelo tratamento das sementes com quitosana. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, Guarapuava-PR, v.5, n.2, p. 33-46, 2012.

GALLAO, MARIA I., CORTELAZZO, ANGELO L., FEVEREIRO, MANOEL P. S. Respostas a quitina em cultura de células de *Citrus aurantium* em suspensão. **Plant Physiology**, v.19, p.69-76, 2007.

GOMES, E. C. S. **Extrato de *Allamanda blanchetti* na indução de fitoalexinas em sorgo e resistência em videira ‘superior seedless’ contra *Uncinula necator***. (Tese de doutorado), Areia, PB, 2011.

GOVERNO DA PARAÍBA- Investe na citricultura na Paraíba. Paraíba, 2012. Disponível em: <http://www.paraiba.pb.gov.br/31933/estado-apoia-festa-da-laranja-e-estimula-producao-em-matinhas.html>. Acesso em: 20 Jul. 2012.

GUZZO, S.D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix***. Piracicaba, 2004. 236p. Tese de doutorado. Centro de energia nuclear na agricultura, Universidade de São Paulo.

IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística: Comentários. Disponível em: [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_\[anual\]/2011pam2011_comentarios.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Producao_Agricola_Municipal_[anual]/2011pam2011_comentarios.pdf). Acesso em: 13 jan. 2014.

ISMAN, M.B. Plant essential oils for pest and disease management. **Crop Protection**, v.19, p.603-608, 2000.

KRISTENSEN, B. K.; BLOCH, H.; RASMUSSEN, S. K. Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. **Plant Physiology**, Rockville, v. 120, p. 501-512, 1999.

LAGRIMINI, L. M.; JOLY, R. J.; DUNLAP, J. R.; LIU, T. T. Y. The consequence of peroxidase overexpression in transgenic plants on root growth and development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 33, p. 887-895, 1995.

LEE H.I.; LEON J.; RASKIN I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, v. 92, p.4076-4079, 1995.

LÉON, J.; LAWTON, M. A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, Rockville, v. 108, p. 1673-1678, 1995.

LIMA, J. de S.; PEREZ, J. O.; BARROS, P. N.; AZEVEDO, L. C.; MENDES, R. B.; PESSOA, R. A. Atividade fungitóxica de extratos vegetais de plantas da caatinga sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em *Vitis vinifera* L. **V CONNEPI**, Maceió-AL, 2010.

LOKHANDE, S. D.; OGAWA, K.; TANAKA, A.; HARA, T. Effect of temperature on ascorbate peroxidase activity and flowering of *Arabidopsis thaliana* ecotypes under

different light conditions. **Journal of Plant Physiology**, New York, v.160, p.57-64, 2003.

LOPES, E. B.; ALBUQUERQUE, I. C.; ARAÚJO, E. Mancha-marrom-de-alternaria: uma grave doença nos pomares de tangerina da Paraíba. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v.3, n.3, p.23-27, 2009.

MARTELLI, I. B. **Manejo da mancha marrom de alternária em citros: poda de limpeza e correlação com a lagarta minadora**. Instituto Agronômico. Campinas-SP Dissertação (Mestrado). 41f. Fevereiro, 2011.

MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U. O.; ARAÚJO, E.L. Taninos: uma abordagem da química a ecologia. **Química Nova**, v.28, n.5, p. 892-896, 2005.

MUNZ, B.; FRANK, S.; HUBNER, G.; OLSEN, E.; WERNER, S. A. A novel type of glutathione peroxidase: expression and regulation during wound repair. **Biochemistry Journal**, London, n.326, p.579-585, 1997.

NAMAI, T. et al. Time-course alteration of lipoxygenase activity in blast-infected rice leaves. **Annals Phytopathology Society**, v.56, p.26-32, 1990.

NEVES, M. F.; TROMBIN, G. V.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI, F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**. Ribeirão Preto: Markestrat, 138 p. 2010.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do Parasitismo: Como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. A.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia. São Paulo: **Agronômica Ceres**. p.545-589. 2011.

PATRO, P. Pau-ferro. Disponível em: <<http://www.jardineiro.net/plantas/pau-ferro-caesalpinia-ferrea.html>>. Acesso em: 29 de Abr. de 2014.

PINTO, K. M. S. **Substâncias bioativas de extratos vegetais no manejo da mancha marrom de alternaria** (*Alternaria alternata* f. sp. *citri*). Areia: CCA/UFPB. (Tese de Doutorado em Agronomia). 119p. 2013.

PIO, R. M.; FIGUEREDO, J. O.; STUCHI, E. S.; CARDOSO, S. A. de B. Variedades copas. In: MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. R.; PIO, R. M.; POMPEU JUNIOR, J. (Ed). Citros. Campinas: **Instituto Agrônômico e Fundag**, p. 37-60. 2010.

QUEIROGA, M; GUERRERO, C; BOTTELA, M.A; BARCELÓ, A; AMAYA, I; MEDINA, M. I; ALONSO, F. J.; DE FORCHETTI, S. M.; TIGIER, H.; VALPUESTA, V. A. Tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. **Plant Physiology**, Rockville, V. 122, p. 1119-1127, 2000.

RABELLO, L. K. C.; RODRIGUES, A. A.; BREMENKAMP, D. M.; FERNANDES, M. A.; SILVA, L. F.; SOUZA, A. F.; ALVES, F. R. Efeito dos óleos de nim (*Azadiractha indica* A. Juss) e mamona (*Ricinus comunnis* L.) no controle “*in vitro*” de *Cercorpora petroselini* (Saccardo). In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTIFICA E PÓS-GRADUAÇÃO. Vale do Paraíba. **Anais**. Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

RAHMAN, M. & PUNJA, Z.K. Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 43: p- 1103-1114. 2005.

REIS, R. F.; GOES, A.; MONDAL, S. M.; TIMMER, L. W. Effectiveness of fungicides and susceptibility of fruit and leaves of tangerines, tangor and tangelos to infection by *Alternaria alternata*, the cause of brown spot. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, p.11-12, 2006.

RONCATO, M. C.; PASCHOLATI, S. F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com leveduras (*Sccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.55, n.3, p.395-402, 1998.

SANGOI, L.; ENDER, M.; GUIDOLIN, A.F.; BOGO, A.; KOTHE, D.M. Incidência e severidade de doenças de quatro híbridos de milho cultivados com diferentes densidades de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.30, n.1, p.17-21, 2000.

SANTOS, F.S., SOUZA, P.E., RESENDE, M.L.V., POZZA, E.A., MIRANDA, J.C., RIBEIRO JÚNIOR, P.M.; MANERBA, F.C. Efeito de extratos vegetais no progresso de doenças foliares do cafeeiro orgânico. **Fitopatologia Brasileira**. v.32. p.059-063. 2007.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberelin, and abscisic acid. **Plant Physiology**, Rockville, v.125, p.1591-1602, 2001.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F; STANGARLIN, J. R; PASCHOLATI, S. F.; Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.) **Interação planta- patógeno: Fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba : FEALQ, p.227-283. 2008.

SHAHBAZI, H.; AMINIAN, H.; SAHEBANI, H.; HALTERMAN, H. A. Biochemical Evaluation of Resistance Responses of Potato to Different Isolates of *Alternaria solani*. **Phytopathology**, [Minnesota]:The American Phytopathological Society, v. 100, n. 5, p. 454-459, 2010.

SIANI, A.C. et al. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p.38-43, 2000.

SILVA, A. R. Tudo sobre aromaterapia: como usá-la para melhorar sua saúde física, emocional e financeira. 2 ed. São Paulo: Editora Roca Ltda, 2001

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de Resistência em Tomateiro por Extratos Aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, p.189-196, 2007.

SILVA, V. N.; GUZZO, S. D.; LUCON, C. M. M.; HAKAKAVA, R. Promoção de crescimento e indução de resistência à antracnose por *Trichoderma* spp. em pepineiro. **Pesquisa agropecuária brasileira**. v.46, n.12, Brasília, 2011.

SOUSA, L. S. S.; SOARES, A. C. F. Efeito “*In Vitro*” Do Extrato Aquoso De Nim (*Azadirachta indica*) E Alho (*Allium sativum* L.) Em *Aspergillus níger*. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n.2, 2009.

SPÓSITO, M. B. Diagnose e controle da pinta-preta e mancha-marrom dos citros. In: Núcleo de estudos em fitopatologia. **Manejo integrado de doenças de fruteiras**. Brasília: Sociedade Brasileira de Fitopatologia. p.259-269, 2007

STICHER, L.; MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.35, p.235-270, 1997.

STUART, R.M.; KUBO, K.S.; BOAVA, L.P.; BASTIANEL, M.; MACHADO, M.A. Jasmonic acid and Ethylene signaling pathways are involved in citrus defenses against *A. alternata* “tangerine pathotype”. In: *Proceedings... OzBio2010*, p.145., 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**; 5ª Ed. Porto Alegre:Artmed, 719p., 2013.

TAKAHAMA, U.; ONIKI, T. Regulation of peroxidase-dependent oxidation of phenolics in the apoplast of spinach leaves by ascorbate. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, UK, v.33. n. 4, p.379-387, 1992.

TIMMER, L. W. Diseases of fruit and foliage. In: _____. Citrus helath management. Saint Paul: APS,,p. 107-115. 1999.

TIMMER, L. W.; GARNSEY, S. M.; GRAHAM, J. H. Compendium of citrus diseases Minnesota: **APS Press**, 2. ed. 128p. 2000.

ULBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Growth comparison of citros rootstocks after artificial infection with *Phytophthora*. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Florida, v. 117, p. 156-160, 2004.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity intomato seedlings and its relationship to bacterial cancker disease resistance. **Phytoparasitica**, Best Dagan, v.34, n.1, p.68-71, 2006.

VELJOVIC-JOVANOVIC, S.; KUKAVICA, B.; STEVANOVIC, B.; NAVARI-IZZO, F. Senescence- and drought-related changes in peroxidase and superoxide dismutase isoforms iin leaves of *Ramonda serbica*. **Journal of Experimental Botany**, Lancaster, v. 57, n. 8, p. 1759-1768, 2006.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review: **Journal of Food Biochemistry**, Malden, v.27, p. 361-422, 2003.